

**Identification de potentiels transporteurs d'acides
aminés impliqués dans la défense contre les pathogènes
d'*Arabidopsis thaliana***

par

Simon Glanowski

Mémoire présenté au Département de biologie en vue
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, avril 2021

Le 28 avril 2021

*Le jury a accepté le mémoire de Monsieur Simon Glanowski
dans sa version finale.*

Membres du jury

Professeur Peter Moffett
Directeur de recherche
Département de biologie
Université de Sherbrooke

Professeur Kamal Bouarab
Évaluateur interne
Département de biologie
Université de Sherbrooke

Professeur Sébastien Rodrigue
Président-rapporteur
Département de biologie
Université de Sherbrooke

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le professeur Peter Moffett qui m'a donné l'opportunité de développer mes compétences scientifiques au sein de l'université de Sherbrooke et dans son laboratoire. C'est grâce aux acteurs comme le SÈVE et la bourse Agrophytoscience que j'ai pu accomplir ma maîtrise.

Merci aux membres de mon comité et évaluateurs, les professeurs Peter Moffett, Kamal Bouarab et Sébastien Rodrigue, que j'ai pu rencontrer et avec qui j'ai pu discuter pendant les moments de difficultés qu'apporte un projet de recherche.

J'aimerais en particulier remercier Charles Roussin-Léveillé qui m'a accueilli au sein de son laboratoire et qui m'a formé ; cette maîtrise n'aurait pas été possible sans ses conseils et discussions sur les différents projets. Dans le même esprit, je veux également remercier notre professionnelle de recherche, la docteure Chantal Brosseau, qui a été ma personne ressource tout au long de la maîtrise. Je remercie mes collègues qui ont été présents pour moi : Guilherme Silva Martins, Varusha Pillay Veerapen, Geneviève Clément et Gaële Lajeunesse. Et enfin, sûrement le plus important des collègues, mon frère, Matthieu Glanowski, qui a toujours cru en moi, qui m'a apporté son soutien dans les temps les plus difficiles et qui était excité de partager les plus beaux moments avec moi, au travail comme dans la vie.

Pour terminer, je voudrais remercier mes parents, Marie-Pierre Glanowski et Frédéric Glanowski, qui ont toujours cru en moi et mes rêves et qui n'ont pas hésité à m'encourager à traverser l'océan pour les accomplir.

SOMMAIRE

Au cours de l'infection de son hôte, un pathogène doit être capable d'accéder aux nutriments stockés dans la cellule hôte. Il a été prouvé qu'une infection bactérienne induit une transcription de transporteurs de sucres, dont le but est d'exporter les sucres vers l'apoplasme, lieu de colonisation et de croissance du pathogène. Dans cette étude, nous investiguons si les transporteurs d'acides aminés sont également surexprimés par manipulation du pathogène afin d'exporter des acides aminés vers l'apoplasme. Dans le même temps, nous investiguons si la plante surexprime des transporteurs d'acides aminés une fois la pathogène reconnu, pour cette fois importer des acides aminés vers le cytoplasme afin d'affamer la bactérie.

PTR3 et les UMAMITs sont respectivement des importeurs et des exporteurs d'acides aminés, suspectés d'être impliqués dans la défense contre les pathogènes bactériens d'*Arabidopsis thaliana*. Dans cette étude, nous montrons que les effecteurs de type 3 de *Pseudomonas syringae* sont requis pour que le pathogène puisse forcer la plante à surexprimer UMAMITs et sous-exprimer PTR3. En testant de nombreuses bactéries mutantes, nous avons identifié des protéines effectrices candidates qui pourraient être nécessaires dans l'induction de l'expression de UMAMIT. Nous avons également étudié la potentielle importance de protéines membranaires dans la résistance systémique acquise (SAR) de la plante activée par acide pipécolique, une phytohormone dérivée de deux acides aminés.

Mots-clés : Transporteurs d'acides aminés, effecteurs de type III, SAR.

TABLE DES MATIÈRES

CHAPITRE 1 INTRODUCTION	1
1.1 Aperçu	1
1.2 Présentation du patho-système <i>A. thaliana</i> – <i>P. syringae</i>	3
1.3 Présentation des SWEET et STP	8
1.4 UMAMITs et PTR3	10
1.4.1 Présentation de PTR3	10
1.4.2 Présentation de UMAMITs	12
1.5 Objectifs	14
CHAPITRE 2 MATÉRIEL ET MÉTHODE	15
2.1 Matériel végétal et condition de croissance	15
2.2 Matériel bactérien et méthode d'innoculation	16
2.3 Extraction d'ARN	18
2.4 RT-qPCR	20
2.5 Pip-priming assay	21

2.6 Décompte bactérien	22
CHAPITRE 3 RÉSULTATS	24
3.1 Résultats préliminaires	25
3.2 Identification des potentiels effecteurs manipulant les transporteurs d'acides aminés ...	29
3.3 Amorçage de la SAR par acide pipécolique (Pipecolic acid priming assay)	32
3.4 Résultats des décomptes bactériens	34
CHAPITRE 4 DISCUSSION ET CONCLUSION	37
4.1 Discussion.....	37
4.2 Conclusion.....	41
CHAPITRE 5 BIBLIOGRAPHIE	43

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Effecteurs de type 3 et CEL de <i>P. syringae</i> (adapté de Wei <i>et al.</i> , 2009).....	6
Tableau 2	Mutants <i>A. thaliana</i> utilisés.....	14
Tableau 3	Mutants <i>P. syringae</i> utilisés.....	17
Tableau 4	Amorces PCR et qPCR utilisées.....	19
Tableau 5	Échantillons pip-priming assay.....	22
Tableau 6	Adapté de la banque de données publique BAR eplant, Stress biotique <i>P. syringae</i> eFP. Expression relative des gènes étudiés 24h DPI.....	25

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Projections globales des besoins en nourriture.....	2
Figure 2	Schéma de l'hypothèse de manipulation des STP/SWEETs.....	9
Figure 3	Relation phylogénétique des transporteurs d'acides aminés du riz et de <i>A. thaliana</i>	13
Figure 4	Schéma de présentation pip-priming assay.....	21
Figure 5	Schéma explicatif d'un décompte bactérien.....	23
Figure 6	Analyse de l'expression relative de PTR3 par qRT-PCR après activation de la PTI de Col-0 par injection de flg22.....	26

Figure 7	Analyse de l'expression relative de gènes codant pour des transporteurs d'acides aminés.....	27
Figure 8	Expression relative de UMAMIT-10 dans Col-0.....	30
Figure 9	Expression relative de PTR3 dans Col-0.....	31
Figure 10	Pip-priming assay sur les mutants <i>lht1</i> et <i>lht7</i>	33
Figure 11	Décompte bactérien sur <i>A. thaliana</i> Col-0 WT, et les mutant <i>ptr3</i> , <i>umamit10</i> ou <i>umamit33</i>	34
Figure 12	Décompte bactérien sur <i>A. thaliana</i> Col-0 WT, et les mutants <i>lht1</i> , <i>lht7</i>	35
Figure 13	Décomptes bactériens sur 3 jours (par intervalle de 24h) sur <i>A. thaliana</i> Col-0 WT, et les mutants <i>ptr3</i> , <i>umamit10</i> ou <i>umamit33</i>	36

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
DC3000	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 (souche Wild type)
DO	Densité optique
DPI	Jour post-inoculation (day post-inoculation)
ETI	Immunité médiée par un effecteur (Effector-Trigered Immunity)
flg22	Flagelline 22
FMO1	Flavine dependant monooxygenase 1
<i>hrcC</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato hrcC</i> (souche mutante sur T3SS)
L	Litre
MgCl ₂	Chlorure de magnésium
mL	Millilitre
mM	Millimolaire
NaCl	Chlorure de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
NHP	N-hydroxypipécolic acid

NPR1	Nonexpressor of pathogenesis-related genes 1
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction)
PTI	Immunité médiée par les PAMPs (MAMP-Triggered Immunity)
RT-PCR	Transcription inverse sur l'ARN suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne
RT-qPCR	Transcription inverse sur l'ARN suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne quantitative
RT	Réaction de transcription inverse (Reverse Transcription)
SAR	Systemic Acquired Resistance
TALEs	Transcription effector like factors
T3SS	Système de sécrétion type III
UFC	Unité formant une colonie
µg	Microgramme
µL	Microlitre
µM	Micromolaire
WT	Type sauvage (Wild Type)

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 Aperçu

L'augmentation de la population humaine accroît le besoin en nourriture et en énergie comme le biocarburant (Figure 1) (Ray *et al.* 2013). En 2050, la capacité de production agricole globale devra augmenter de 60% à 110% pour répondre à ces besoins croissants (Tilman *et al.* 2011). Cependant, la place est limitée pour créer de nouvelles terres agricoles, la sécurité alimentaire viendra donc d'une augmentation des rendements des cultures déjà existantes (Muir *et al.* 2010; Foley *et al.* 2011). Les pathogènes sont responsables de la baisse en quantité et en qualité de nombreuses plantes à intérêts économiques. Les cultures les plus répandues comme le blé, le riz, le soja, le maïs, les patates ou les tomates peuvent perdre près de 10% à 41% suite à l'exposition d'un champ à son pathogène respectif (Savary *et al.* 2019). Il est donc important d'étudier et de mieux comprendre les mécanismes d'agression des pathogènes ainsi que les mécanismes de défense des plantes.

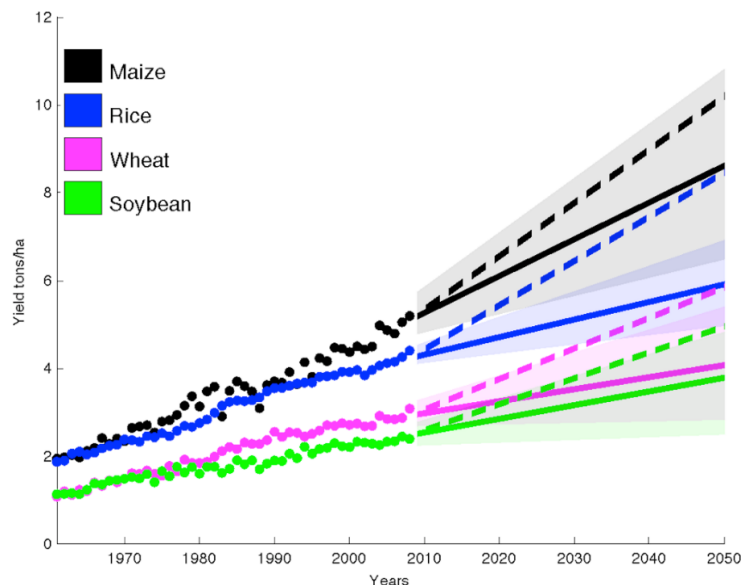


Figure 1 : Projections globales des besoins en nourriture

Comparaison à la projection de l'augmentation de la production des cultures majeures. Les lignes pointillées représentent les besoins et les lignes pleines l'augmentation réelle (Ray *et al.* 2013)

L'acquisition de nutriments comme les acides aminés ou les sucres est essentielle pour la survie de tout organisme. Les pathogènes ont donc développé différentes stratégies pour obtenir les nutriments nécessaires à leur croissance. En contrepartie, les plantes ont évolué pour affamer leurs agresseurs en réabsorbant les nutriments, situés dans le lieu de prolifération du pathogène (l'apoplasme). Les transporteurs membranaires de nutriments de la cellule hôte semblent être des candidats intéressants pour la croissance du pathogène ou la défense de l'hôte, via la réabsorption de ces nutriments ou l'activation des systèmes immunitaires de la plante.

Ce mémoire s'intéressera à différents transporteurs d'acides aminés de la plante et comment ils sont exprimés lors d'une situation d'agression par un pathogène. Cette expression sera manipulée à la fois par la plante pour sa défense et par le pathogène pour sa prolifération : c'est une course à l'armement.

1.2 Présentation du patho-système *A. thaliana* – *P. syringae*

Le patho-système étudié dans ce mémoire se compose de la plante type de laboratoire *Arabidopsis thaliana* et d'une bactérie Gram négatif *Pseudomonas syringae*. Ce patho-système est intéressant à étudier dans le cadre d'une recherche fondamentale, car *A. thaliana* est une plante très bien caractérisée et très fréquemment utilisée par de nombreux laboratoires de recherche. Cette herbe de la famille de la moutarde est la première plante dont le génome a été séquencé au complet. Elle est utilisée comme plante modèle en biologie moléculaire grâce à son petit génome (7×10^7 paires de bases) et son temps de génération court (5 à 8 semaines) (Poczai *et al.* 2014). Il existe aussi une grande quantité de ressources disponibles pour travailler avec cette plante, comme par exemple une banque des mutants viables disponibles, ce qui donne accès à des graines intéressantes rapidement et à faible coût (TAIR : The Arabidopsis Information Resource). De plus, le pathogène *P. syringae* pv. *Tomato* (*Pst*) est également le pathogène d'une plante d'intérêt économique, *Solanum lycopersicum*, la tomate.

Cette bactérie pathogène va envahir les feuilles de la plante par des stomates ouvertes ou des blessures dans l'épiderme, puis va vivre et se reproduire dans l'espace extracellulaire qu'est l'apoplasme. Il existe une barrière mécanique et structurelle primaire dont le but est d'empêcher la colonisation par le pathogène. La cuticule de la plante qui recouvre les cellules de l'épiderme est une couche protectrice contre les stress biotiques; elle est constituée de lipides, de sucres et de cires (Fernández *et al.* 2016). Les stomates sont des ouvertures naturelles nécessaires aux échanges gazeux de la plante; c'est un lieu d'entrée idéal pour le pathogène et les plantes ont donc évolué pour fermer ces ouvertures après reconnaissance d'une bactérie telle que *P. syringae* (Zhang *et al.* 2018). De plus, les défenses chimiques sont assurées par des composants antimicrobiens telle que la phytoalexine qui agira comme une toxine antimicrobienne et peut rapidement être synthétisée *de novo* après infection d'un pathogène (Ahuja, Kissen, and Bones 2012). Une fois que le pathogène est passé au travers des défenses physique et chimique de la plante, grâce à une blessure par exemple, la plante doit être capable de reconnaître la bactérie pour pouvoir activer ses différents systèmes de défense.

Pst, comme de nombreux pathogènes bactériens, va utiliser un système de sécrétion de type 3 (T3SS), un complexe protéique qui va fonctionner comme une "seringue" et injecter de nombreuses protéines effectrices dans la cellule hôte. Ces effecteurs sont utilisés par la bactérie pour réprimer le système immunitaire de la plante ou pour changer son métabolisme, donc pour donner un avantage au pathogène (Grant *et al.* 2006).

Cette compétition entre le pathogène et son hôte suit un modèle en "zig-zag" (Wang *et al.* 2021). La première étape après infection est donc la perception de celle-ci par la plante grâce à des interactions entre des molécules de surfaces (protéines, peptides, sucres ou lipides) de la bactérie, appelées "microbe/pathogen associated molecular patterns" (MAMPs/PAMPs), comme le peptide flagelline, et des récepteurs de la cellule hôte, comme le récepteur kinase flagellin-sensible 2 (FLS2) qui reconnaît l'épitope flg22 de la flagelline. Le changement de conformation de FLS2, causé par son interaction avec flg22, entraîne une association avec le co-récepteur "brassinostéroïde insensible 1 (BRI1)-associated receptor kinase 1" (BAK1) et transmet ainsi un signal par cascade de phosphorylation (Chinchilla *et al.* 2007). Cette reconnaissance du pathogène par la cellule hôte va déclencher la "PAMP-Triggered Immunity" (PTI). La plante peut également détecter des "damage-associated molecular patterns" (DAMPs), qui sont des produits de dégradation de la plante résultant d'une invasion d'un pathogène ou d'une blessure. Les DAMPs peuvent être des protéines nucléaires ou cytosoliques dénaturées en passant d'un environnement réducteur à un environnement oxydant suite à une lésion. D'autres exemples de DAMPs peuvent être l'ATP, l'acide urique ou l'ADN libéré après la nécrose (Rubartelli and Lotze 2007). Ces DAMPs activent également la PTI (Yamaguchi and Huffaker 2011). La réponse la plus rapide connue à ce jour face à une reconnaissance de MAMP/PAMP est un influx extracellulaire de Ca^{2+} dans le cytoplasme qui arriverait entre 30 secondes et 2 minutes après reconnaissance de flg22. Cet influx de Ca^{2+} entraînerait une cascade de phosphorylation des "mitogen activated protein kinases" (MAPK) (Jeworutzki *et al.* 2010). Entre 2 et 3 minutes après la reconnaissance d'un MAMP, on observe une production extracellulaire de "reactive oxygen species" (ROS), principalement constitué de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), qui ont un effet toxique sur les pathogènes. Cet influx de H_2O_2 va se

diffuser dans le cytosol après avoir été activé par plusieurs autres réponses de défenses de la plante comme les "pattern recognition receptor" (PRR), couplés aux protéines Gp-G, entraînant une cascade de signalisation par les MAPK et CDPK (Calcium-dependant protein kinase), plant NADPH oxydase GP91^{PHOX}, peroxydase 33 et 34 de classe III qui permettent la transformation d'O₂ en H₂O₂ activant des facteurs de transcription (TF) qui changeront l'expression génique de la plante (O'Brien *et al.* 2012).

La seconde étape de ce schéma en "zig-zag" est l'injection des effecteurs de la bactérie par son T3SS afin de réprimer cette PTI et d'induire la susceptibilité au pathogène. Cette étape s'appelle "Effector Triggered Susceptibility" (ETS). (Nomura, Melotto, and He 2005).

Le génome de *P. syringae* montre une collection de 18 effecteurs de types 3 séparés en 6 "clusters", ou groupes (colorés en rose) ainsi que le "conserved effector locus" (CEL) (tableau 1) (Wei *et al.* 2009). Les fonctions de plusieurs de ces effecteurs suivent un ordre hiérarchique. AvrPtoB supprime l'immunité de l'hôte, permettant à d'autres effecteurs d'augmenter la croissance du pathogène (HopM1 et HopE1), de démarrer la chlorose (HopG1), de former des lésions (HopAM1-1) et d'augmenter la production de symptômes (AvrE) (Cunnac *et al.* 2011). Ces différents effecteurs injectés par le T3SS sont responsables de la virulence de *P. syringae*. Il existe encore des effecteurs dont la fonction est moins bien définie.

Tableau 1 : Effecteurs de type 3 et CEL de *P. syringae* (adapté de Wei *et al.*, 2009)

Groupe d'appartenance "Cluster"	Nom de l'effecteur
	hopK1
	hopY1
Cluster I	hopU1
	hopF2
Cluster II	hopH1
	hopC1
Cluster IV	hopD1
	hopQ1-1
	hopR1
	hopAM1-1
Cluster VI (CEL)	hopN1
	hopAA1-1
	hopM1
	avrE
	hopB1
	hopAF1
	avrPtoB
	avrPto
	hopE1

Tableau 1 : suite

Cluster IX	hopAA1-2
	hopY1
	hopAO1
	hopG1
	hopI1
	hopA1
Cluster X	hopAM1-2
	hopX1
	hopO1-1
	hopT1-1

Suite à cette injection d'effecteurs, la plante peut reconnaître les effecteurs via des protéines de résistance, les récepteurs "Nucleotide binding oligomerization domain containing Leucine-rich Repeat" (NLR), pour ainsi déclencher l'"Effector Triggered Immunity" (ETI) qui est une immunité plus efficace de la plante contre le pathogène (Jones and Dangl 2006). Cette ETI va entraîner une production de phytohormones, et autres protéines, qui serviront de messagers à travers la plante afin de déclencher une réponse systémique (Systemic Acquired Resistance, SAR), et permettre à la plante de résister à son agresseur, dans notre cas, *P. syringae*.

Cette SAR nécessite la collaboration de deux phytohormones régulatrices de l'immunité chez la plante : l'acide salicylique (SA) et l'acide pipécolique (Pip). Les études transcriptomiques ont révélé que l'établissement de la SAR chez *A. thaliana* est caractérisé par une forte réponse transcriptionnelle systémique induite dans les feuilles qui préparent la plante à de futures attaques de pathogènes en pré-activant de nombreux signaux des différentes étapes de défense.

L'augmentation des niveaux systémique d'acide pipécolique est indispensable pour la SAR et nécessaire pour toute la transcription de la réponse SAR. Pendant la SAR, Pip enclenche les réponses contre l'infection de *Pseudomonas* de façon SA-dépendante et également SA-indépendante par l'activation du gène "Flavin Dependent-MonoOxygenase 1" (FMO1) qui catalyse Pip en "N-hydroxy-pipecolic acid" (NHP). L'acide aminé NHP s'accumule de façon systémique dans les feuilles de la plante suite à une infection d'un pathogène et induit la SAR contre les bactéries (Hartmann *et al.* 2018). NHP confère l'immunité via les récepteur d'acide salicylique NPR1 pour changer la transcription de la plante et ainsi lui permettre de se défendre plus efficacement (Zeier 2021). Le module Pip/FMO1 agit donc comme un activateur indispensable de la SAR et l'acide salicylique amplifie les réponses enclenchées par l'acide pipécolique (Bernsdorff *et al.* 2016).

1.3 Présentation des SWEET et STP

Pour comprendre la direction de cette étude, il faut d'abord présenter les travaux d'une étude publiée dans la revue Nature (Chen *et al.* 2010) qui porte sur des transporteurs membranaires de sucres : les "Sugar Will Eventually be Exported Transporters" (SWEETs) et les "Sugar Transports Proteins" (STPs). Le pathogène utilisé dans cette étude est *Xanthomonas oryzae* dont l'hôte principale est le riz (*Oryza sativa*). La plante type de laboratoire *A. thaliana* est utilisée comme hôte. La maladie causée par ce pathogène, la "leaf blight" peut avoir des conséquences désastreuses sur les récoltes si les conditions sont favorables pour la bactérie (Yu *et al.* 2021). Il était donc important pour cette équipe de chercheurs de comprendre comment *Xanthomonas* obtenait ses nutriments lors de l'infection de la plante.

Le pathogène *Xanthomonas oryzae* utilise des "Transcription-Activator Like Effectors" (TALEs) pour manipuler le métabolisme de son hôte à son propre avantage (de Lange *et al.* 2013). Les SWEETs sont des exporteurs de sucres situés dans la membrane plasmique et les STPs, à l'inverse des importeurs de sucres, également situés dans la membrane plasmique. Le pathogène manipule l'expression des gènes de la cellule hôte via les TALEs, ce qui a pour

résultat une augmentation de l'expression des SWEETs. Cette accumulation de SWEETs augmente le flux de sucres vers l'apoplasme où prolifère la bactérie. STP13 est surexprimé lors de la PTI pour, à l'inverse, réabsorber les sucres dans le cytoplasme, inaccessible pour le pathogène. Cette surexpression de STP13 contribue à la résistance au pathogène en limitant le développement des symptômes et en permettant l'augmentation de consommation d'énergie de la plante pour se défendre contre son agresseur (Lemonnier *et al.* 2014). On voit donc ici une course à l'armement entre le pathogène et son hôte pour arriver à voler (ou garder) le plus de nutriments possibles, soit les sucres (figure 2) (Bezruczyk *et al.* 2018).

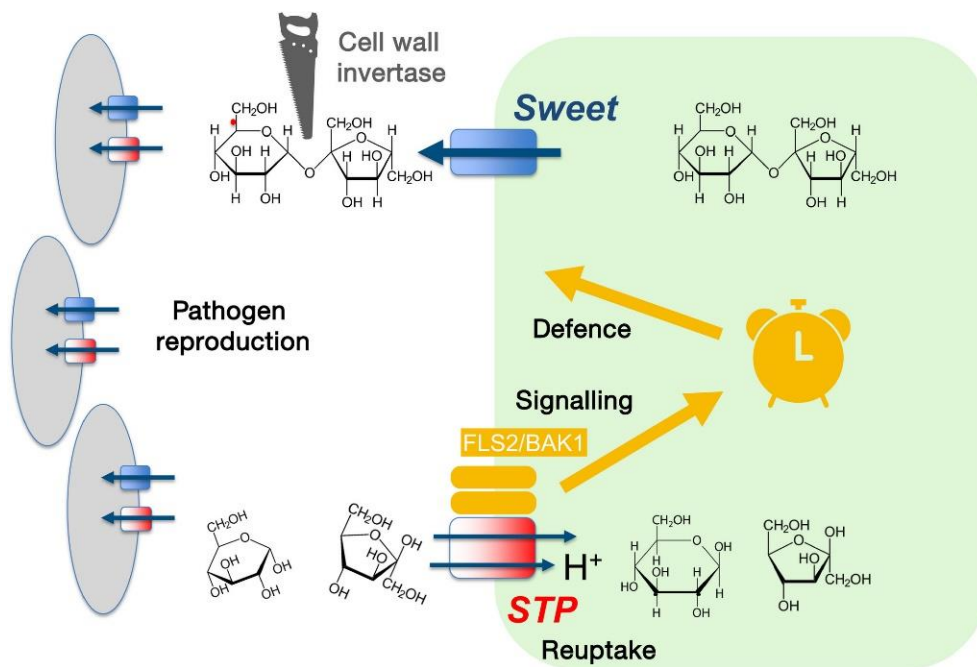


Figure 2 : Schéma de l'hypothèse de manipulation des STP/SWEETs

La cellule hôte cherche à affamer le pathogène après reconnaissance des PAMP par FLS2/BAK1 (Bezruczyk *et al.* 2018).

1.4 UMAMITs et PTR3

À l'instar de l'étude de Chen *et al.* (2010) montrant une manipulation des flux de sucres, notre hypothèse est qu'il existe d'autres exporteurs et importeurs de nutriments essentiels au pathogène et à l'hôte dont l'expression sa manipulée par ces derniers. Outre les sucres, les acides aminés font partis des nutriments nécessaires à la prolifération du pathogène ou la survie de la plante. En plus d'être nécessaire à la synthèse de protéines, les acides aminés sont étroitement liés à la production d'énergie, au métabolisme des carbohydrates, au budget carbon/azote, aux hormones et métabolites secondaires ou encore aux réponses aux stress (Yang, Zhao, and Liu 2020). Bien que le pathogène puisse synthétiser certains acides aminés à partir d'une source de carbone et d'une source d'azote, relocaliser des acides aminés du cytosol vers son lieux de prolifération est probablement avantageux pour lui.

Le génome de *A. thaliana* étant séquencé au complet, on peut étudier de nombreuses protéines annotées aux fonctions inconnues (Karim and Lundh 2005). Les banques de données publiques nous ont permis de sélectionner des candidats qui seront décrits dans ce mémoire.

1.4.1 Présentation de PTR3

Le "Major Facilitator Superfamily" (MFS) est l'un des plus grands groupes de transporteurs membranaires et est présent dans les trois groupes d'organismes vivants : les bactéries, les archéobactéries et les eucaryotes (Rédei 2008). Ces transporteurs sont des pompes à protons qui transportent une grande variété de molécules, comme les ions, les sucres, les nucléotides, les acides aminés, les peptides, de façon uniport, symport ou antiport. L'acquisition et l'allocation de composés nitrogéniques, incluant peptides et acides aminés, est essentielle pour la plupart des organismes vivants. Il existe 22 familles caractérisées de transporteurs qui peuvent transporter les acides aminés et seulement 4 familles peuvent transporter les peptides (Saier 2000). Les transporteurs de peptides faisant partie de la famille des "di-/triPeptide Transporter Family" (PTR) ont une taille de 450 à 600 acides aminés et sont habituellement composés de 12

régions hélices α transmembranaires. Ces transporteurs sont considérés comme faisant partie du MFS et déplacent en symport un ou plusieurs ions H^+ avec la molécule transportée (Chang *et al.* 2004).

Les analyses phylogénétiques des transporteurs de la famille PTR indiquent qu'ils peuvent être classifiés en quatre groupes selon la présence et la localisation de la boucle hydrophile dans les protéines (Almagro, Shan, and Yi 2008). Les groupes I à III contiennent des transporteurs appartenant aux bactéries, animaux et champignons, respectivement. Alors que le groupe IV contient un mélange de transporteurs de peptide et de nitrate chez les plantes ainsi que des transporteurs de peptides et d'histidine chez les mammifères. Bien qu'homologues, les transporteurs de nitrates et les transporteurs de peptides des plantes semblent former un groupe distinct dans cette famille (Lin *et al.* 2000). Cependant, plusieurs PTR appartenant aux plantes semblent être capables de transporter ces 2 composés ainsi que d'autres molécules comme les acides aminés ou les chlorates (Galván and Fernández 2001).

Une étude (Karim *et al.* 2007) suggère que l'importeur d'acides aminés PTR3 est impliqué dans la défense d'*A. thaliana* contre *P. syringae*. Dans une précédente publication, les auteurs de cette étude ont caractérisé le gène codant pour le transporteur de peptide *AtPTR3* (*At5g46050*), identifié grâce à un gène rapporteur *gus* (β -Glucuronidase). Dans leur lignée exprimant la protéine fusion PTR3-GUS, une forte activité de GUS pouvait être observée autour des blessures (Karim and Lundh 2005). Une blessure de la plante, entraînant la nécrose de cellules, va libérer des DAMPs (Rubartelli and Lotze 2007) qui activeront la PTI. Activer la PTI va donc augmenter l'expression de PTR3 autour de la blessure.

Les plantes mutantes, dont le gène *AtPTR3* est manquant, sont plus susceptibles face à *P. syringae*. De plus, ces travaux ont permis de montrer que l'expression de *AtPTR3* est réduite suite à une injection d'effecteurs de type III (Karim *et al.* 2007).

1.4.2 Présentation des UMAMITs

Les transporteurs d'acides aminés forment deux familles parmi les plantes. Ces familles se regroupent selon leur similarité de séquence et leur capacité de transport : la famille des "amino acid/auxin permease" (AAP) -aussi appelée "amino acid transporter family" (ATF)- et la famille des "amino acid-polyamine-organocation" (APC) (Ludewing and Koch 2008). La famille AAP peut être divisée en plusieurs autres sous-familles : "general amino acids transporters" (AAPs), "lysine and histidine transporters" (LHTs, qui seront abordés dans ce mémoire), " γ -aminobutyric acid transporters" (GATs), "proline transporters" (ProTs) et "indole-3-acetic acid transporters" (AUXs). La famille APC est composée de trois sous familles : "cationic amino acid transporters" (CATs), "amino acid/choline transporters" et "polyamine H⁺-symporters" (PHSs) (Tegeder and Rentsch 2010). Un groupe supplémentaire, désigné "usually multiple acids move in and out transporters" (UMAMIT), a récemment été identifié chez *A. thaliana* (figure 3) (Yao *et al.* 2020).

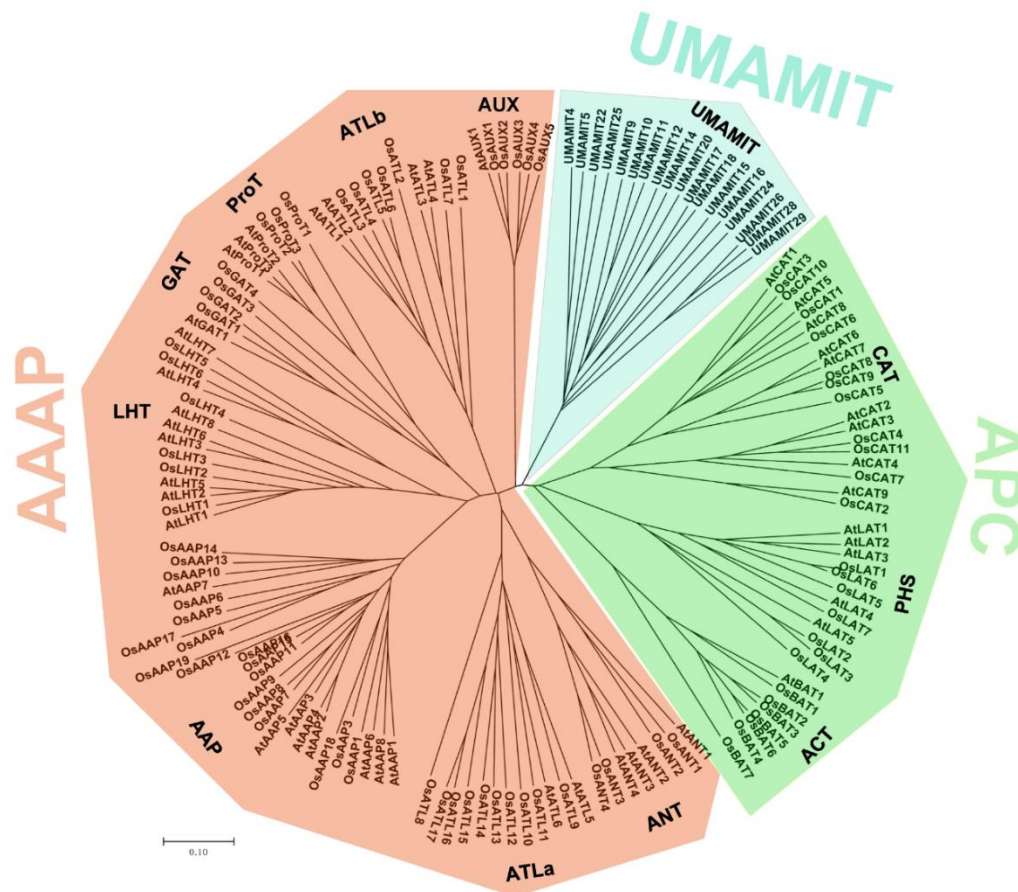


Figure 3 : Relation phylogénétique des transporteurs d'acides aminés du riz et de *A. thaliana*

L'alignement de séquence multiple a été effectué par Clustal X et l'arbre phylogénétique a été construit en utilisant MEGA7. Les familles AAAP, APC et UMAMIT s sont différenciées pas des couleurs de fonds différentes (Yao *et al.* 2020)

Les protéines UMAMITs sont des exporteurs d'acides aminés non spécifiques, situés dans la membrane plasmique, et seraient potentiellement impliquées dans la translocation d'acides aminés dans les feuilles ou dans le spermodermes des graines. Ils auraient une fonction similaire aux SWEETs pour les flux de sucres (Eom *et al.* 2015; Müller *et al.* 2015). Deux variants de cette protéine, UMAMIT10 et UMAMIT33, seront décrits dans ce mémoire.

1.5 Objectifs

A. thaliana surexprime des protéines membranaires (STP) pour réabsorber les sucres à la suite de la reconnaissance du pathogène *Xanthomonas oryzae* (Chen *et al.* 2010). Un autre système de réabsorption de nutriments existe-t-il pour les acides aminés à la suite d'une infection par *P. syringae* ? En contrepartie, *Xanthomonas oryzae* injecte de TALEs dans la cellule hôte pour pouvoir forcer la surexpression des exporteurs de sucres (SWEETs).

P. syringae injecte-t-il des effecteurs de type III pour augmenter l'expression d'exporteurs d'acides aminés ? Si oui, peut-on identifier quels sont ces effecteurs ? Et enfin, ces systèmes de transports d'acides aminés sont-ils impliqués dans la défense d'*A. thaliana* au niveau systémique ?

L'objectif de ce mémoire est de vérifier si les transporteurs d'acides aminés PTR3/UMAMIT ont un rôle équivalent aux transporteurs de sucres STP/SWEET. C'est-à-dire d'évaluer si le pathogène manipule l'expression d'un exporteur pour son propre bénéfice (UMAMITs pour les acides aminés et SWEETs pour les sucres), et d'investiguer si les systèmes de défenses de la plante entraînent la surexpression d'un importeur de nutriments pour affamer le pathogène (PTR3 pour les acides aminés et STP pour les sucres). Nos hypothèses sont donc les suivantes :

Partie 1 :

- PTR3 donne un avantage à la plante lors d'une infection en affamant le pathogène
- UMAMIT donne un avantage au pathogène en transportant les acides aminés vers l'apoplasme

Partie 2 :

- Les transporteurs d'acides aminés sont impliqués dans la réponse de défense systémique de la plante (SAR) de manière dépendante de l'acide pipécolique

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODE

2.1 Matériel végétal et condition de croissance

La plante principale utilisée au cours de ce projet est *A. thaliana*; l'écotype Columbia 0 (Col-0) est la plante contrôle pour toutes les expériences. En plus de Col-0, des plantes mutantes sur différents gènes sont utilisées (tableau 2). Ces mutants ont un background Col-0 et ont été commandés sur The Arabidopsis Information Resource, TAIR (<https://www.arabidopsis.org/index.jsp>). Voici une liste des mutants *A. thaliana* utilisés :

Tableau 2 : Mutants *A. thaliana* utilisés

Mutants <i>A. thaliana</i>	Germplasma TAIR
<i>ptr3</i>	SALK_003119C
<i>umamit10</i>	SALK_095207
<i>umamit33</i>	CS840653
<i>lht1</i>	SALK_050031
<i>lht7</i>	SALK_091561

Toutes les graines d'*A. thaliana* sont vernalisées avant de passer en chambre de croissance; c'est-à-dire qu'elles passent 3 jours à 4°C pour simuler l'hiver. Ces graines poussent dans le mélange Agromix de Fafard avec un cycle jour/nuit de 12h à 23°C. Les plantes sont utilisées après 4 semaines en chambre de croissance.

2.2 Matériel bactérien et méthode d'innoculation

La bactérie principale utilisée dans ce projet est *P. syringae pv tomato* DC3000. Ce pathovar est la bactérie de type sauvage (DC3000 = WT). En plus de DC3000, des mutants de délétions de différents gènes obtenus chez cette même bactérie sont utilisés; ces mutants ont été obtenus par le biais d'une collaboration entre le laboratoire du Dr Peter Moffet et du Dr Sheng Yang He de l'université de l'état du Michigan ainsi que d'une collaboration avec le Dr Alan Collmer, professeur au Collège de l'agriculture et des sciences de la vie (CALS). À part le mutant *hrcC* auquel il manque le système de sécrétion type 3, les autres souches sont toutes mutées sur un ou plusieurs groupes d'effecteurs de type 3.

Tableau 3 : Mutants *P. syringae* utilisés

Mutants <i>P. syringae</i>	Gènes mutés
<i>hrcC</i> -	T3SS
CUCPB5445	Cluster II, hop C1 et hop H1
CUCPB5448	Clusters II et IV
CUCPB5451	Clusters II, IV et IX
CUCPB5452	Clusters II, IV et IX
CUCPB5459	Tous les clusters excepté le CEL
CUCPB5460	hopQ1-1
CUCPB5500	Tous les clusters
CUCPB5585	Tous les clusters et tous les singlets

Ces bactéries (tableau 3) croissent en milieu solide pendant 48 heures (milieu LBA *lysogeny broth agar*) puis en milieu liquide pendant 24 heures avec un antibiotique sélectif : rifampicin.

- 500 mg NaCl (chlorure de sodium)
- 500 mg peptone
- 250 mg d'extrait de levure
- 500 µL rifampicin 50 g/L (préparé avec méthanol et 5 gouttes de NaOH 10 N (Hydroxyde de sodium))
- 7,5 g Agar pour une concentration de 1,5% (seulement pour milieu solide).

L'inoculation de la charge bactérienne sur les plantes se fait par injection avec une seringue sans aiguille de 1,5 mL. La densité optique (DO) utilisée pour l'infection est de 0,2 pour une future extraction d'ARN ou de 0,0002 pour un futur décompte bactérien.

2.3 Extraction d'ARN

Pour l'extraction d'ARN, en vue d'une RT-PCR, 100 mg de tissu sont broyés dans de l'azote liquide, puis l'ARN est extrait en utilisant le kit « RNA extraction kit » de Qiagen, suivi d'un traitement DNases avec le kit DNase de Qiagen. Pour les deux kits, les recommandations des protocoles sont suivies sans modification. La qualité et la pureté de l'ARN sont vérifiées par l'utilisation d'un spectrophotomètre ; le degré de pureté (ratio 260/230) ciblé est compris entre 1,7 et 2,2. L'intégrité de l'ARN est vérifiée par une électrophorèse dans un gel d'agarose à 1,5%. Une fois ces vérifications effectuées, l'ADNc est synthétisé à partir de l'ARN obtenu précédemment avec l'utilisation du kit « All-in-one RT MasterMix » d'abm® en suivant le protocole et en appliquant 1000 ng d'ARN par échantillon. Les différentes amorces utilisées sont disponibles dans le tableau 4.

Tableau 4 : Amorces PCR et qPCR utilisées

Amorces	Séquences 5' → 3'
qPCR_AtPTR3_F	AGGTGTTTGAACGGATGGCT
qPCR_AtPTR3_R	GTCTCCAACGTAAGCACCCA
qPCR_FMO1_F	TCTTCTGCGTGCCGTAGTTTC
qPCR_FMO1_R	CGCCATTTGACAAGAAGCATAG
qPCR-UMAMIT10_F	TCTAGCTCTTCTCGGGCCTT
qPCR-UMAMIT10_R	TGTCCCCACCACTTTTGCTT
qPCR-UMAMIT18_F	TCAGGCTTGAGACGGTGAAC
qPCR-UMAMIT18_R	CTCGAACCACCGTGGAAGA
qPCR-UMAMIT20_F	TGGGACATTGGTGGGTCTTG
qPCR-UMAMIT20_R	CAGACCAAGCAACACAACCG
qPCR-UMAMIT33_F	ACTCGGCTGCTTCTTCCTTC
qPCR-UMAMIT33_R	AGGAATCAAGCTTCCAGGGC
qPCR-atACT2_F	TGCTGTTGACTACGAGCAGG
qPCR-atACT2_R	CGAGGGCTGGAACAAGACTT

2.4 RT-qPCR

Les différentes expériences de RT-qPCR sont réalisées dans l'appareil CFX96 de BioRad®, permettant une analyse de l'expression relative. Chaque réaction contient un Mastermix SYBR Green de WISENT, 400 µM des deux amorces ainsi qu'une dilution au 1/5 de 2 µg d'ADNc. Les cycles d'amplification sont les suivants après optimisation : 10 min 95°C puis 44 cycles avec 4 sec à 95°C et 4 sec à 60°C puis une élongation finale de 10 secondes à 95°C. Ces cycles sont suivis par l'étape des courbes de fusion afin de vérifier la spécificité des amorces utilisées. Toutes les réactions de RT-qPCR sont réalisées en triplicatas biologiques et techniques. Pour normaliser les résultats, un gène de référence doit être déterminé. Pour *A. thaliana*, c'est l'actine ACT2 qui est le gène de référence. Pour obtenir l'expression relative des analyses, la formule mise en place par Pfaffl (2001) est utilisée. Les cycles seuils (Ct : Cycle threshold) de chaque échantillon et chaque réaction sont tout d'abord convertis en expression relative (ER). Pour ce faire, on normalise les Ct pour chaque échantillon, ce que l'on nomme Ct 1; on fait de même pour les Ct de la condition contrôle (Ct Ø). La différence de ces deux Ct nous donne : $\Delta Ct1 = Ct1 - Ct \emptyset$. Par la suite, une deuxième normalisation est effectuée pour les gènes de références (Ct ref) ainsi que la condition contrôle (Ct Øref). De même que précédemment, la différence des deux donne : $\Delta Ctref = Ct \text{ ref} - Ct \emptyset \text{ ref}$. Pour déterminer l'expression relative, il faut également prendre en compte l'efficacité des amorces (EA). Ceci correspond à la formule suivante pour l'expression relative : $ER = EA1^{(\Delta Ct1)} / EAref^{(\Delta Ctref)}$. Une fois l'expression relative obtenue, il reste l'analyse statistique à réaliser. Cette dernière se fait par ANOVA à comparaison multiple ou par un test T selon l'expérience réalisée.

2.5 Pip-priming assay

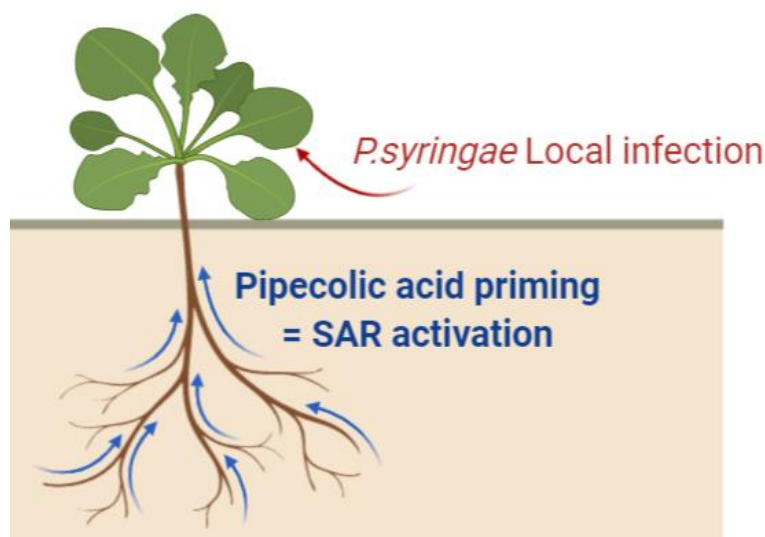


Figure 4 : Schéma de présentation pip-priming assay

L'acide pipécolique est absorbé par les racines. Ce signal d'acide pipécolique active la SAR dépendante de l'acide pipécolique. Le pathogène est injecté sous les feuilles qui seront prélevées (infection locale). Ce test nous permet de vérifier si la plante est capable d'activer la SAR après exposition à l'acide pipécolique, pour pouvoir se défendre plus efficacement contre *P. syringae*.

Le pip-priming assay consiste à exposer les racines de la plante à l'acide pipécolique avant une infection des feuilles par *P. syringae* pour activer la SAR (figure 4). Les racines sont donc traitées avec 10 mL d'eau (contrôle) ou avec de l'acide pipécolique 1mM. Vingt-quatre heures plus tard, les feuilles sont infectées par une concentration bactérienne de *Pseudomonas* correspondant à une DO à 600 nm de 0,001 ou avec une solution de MgCl₂ 10 mM (contrôle) (tableau 5). Dix heures plus tard, les échantillons (feuilles infectées) sont récoltés pour faire un décompte bactérien et/ou un RT-qPCR. Voici les quatre conditions finales du pi-priming assay (Bernsdorff *et al.* 2016).

Tableau 5 : Échantillons pip-priming assay

Nom de l'échantillon	Priming	Infection foliaire
Mock-mock	Eau	MgCl ₂
Mock-DC3000	Eau	<i>P. syringae</i> DC3000
Pip-mock	Acide pipécolique	MgCl ₂
Pip-DC3000	Acide pipécolique	<i>P. syringae</i> DC3000

2.6 Décompte bactérien

Le matériel végétal est infecté avec le matériel bactérien à une DO de 0,0002, soit 10^5 unités formant des colonies (UFC)/mL. Les échantillons (feuilles infectées) sont prélevés 3 jours post infection (DPI). L'épiderme des feuilles prélevées est ensuite stérilisé à l'éthanol 70% puis rincé à l'eau stérile. Les échantillons sont dilués en série avec du MgCl₂ 10 mM stérile, puis 10 µL par concentration sont étendus sur un milieu LBA avec rifampicin. Chaque condition de l'expérience est faite en triplicata biologique et en triplicata technique (figure 5).

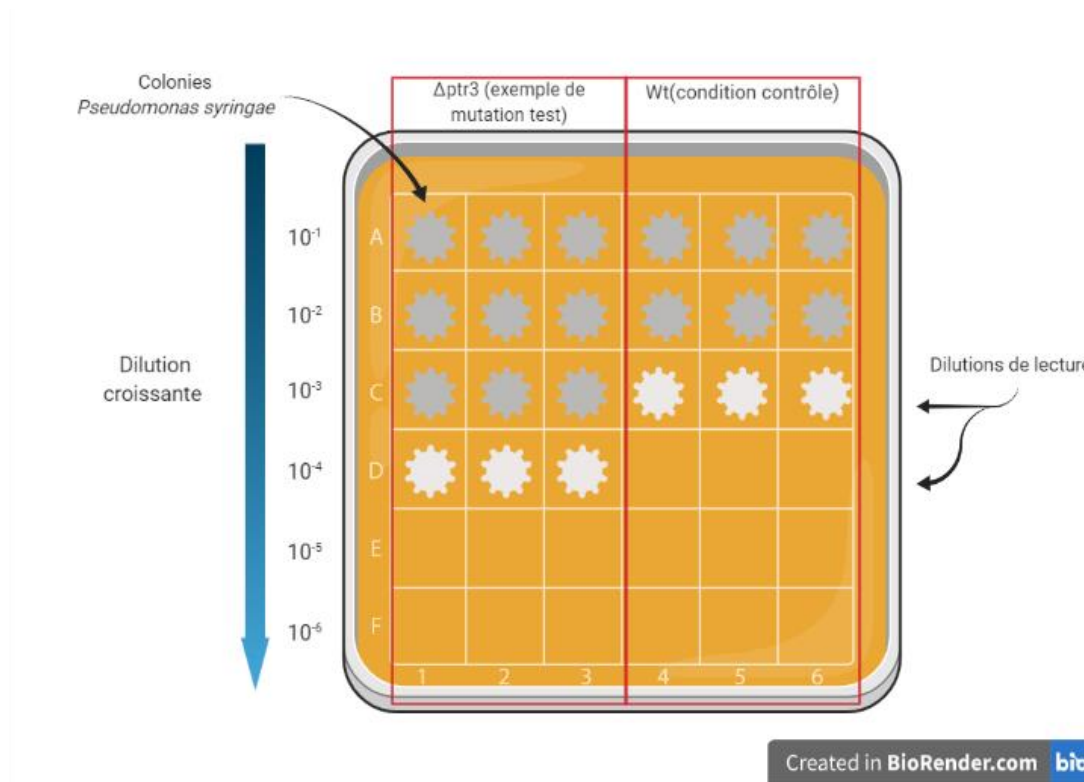


Figure 5 : Schéma explicatif d'un décompte bactérien

La concentration bactérienne est divisée par 10 à chaque ligne (dilution en série). 3 répliques biologiques avec 3 répliques techniques (colonnes) sont faits.

Deux jours après incubation à 28°C, les colonies (C) à la dernière dilution visible (D) (C doit être entre 20 et 200 colonies) sont comptées. La taille en centimètre carré de chaque disque de feuille prélevé est nommée S et le volume d'échantillon, en Litre (L), par section de la plaque, est nommé V. Pour avoir le nombre de bactérie (B) en colonie, formant unité par centimètre carré, on effectue le calcul suivant : $B = ((C / V) * 10^D) / S$. Les histogrammes sont construits en prenant la valeur $\log(B)$ et l'analyse statistique est faite par un test T.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

3.1 Résultats préliminaires

Les résultats préliminaires qui ont lancé le projet ont été obtenu par une banque de donnée publique sur bar.utoronto.ca/eplant/. Les résultats présentés dans le tableau 6 sont des résultats de Gene chip de données publiques générées par le laboratoire de Nuemberger dans le cadre du projet AtGeneExpress. La puce à ADN (ou DNA microarray) permet d'évaluer le niveau d'expression relative de milliers de gènes simultanément en utilisant une phase solide sur laquelle les amorces complémentaires aux ARNm des gènes cibles sont attachées. Plus il y a d'hybridation entre l'ARNm de l'échantillon et les sondes d'ADN de la micropuce, plus l'expression relative est forte.

Les échantillons sont générés de trois façons différentes : soit par un traitement contrôle de 10mM de MgCl₂, soit une infection avec le pathogène virulent *P. syringae* DC3000, soit avec le pathogène avirulent *P. syringae hrcC* qui n'a pas de système de sécrétion type III (T3SS) fonctionnel. Les deux infections bactériennes ont été faites à une concentration de 10⁸ UFC/mL pendant 24h.

Les résultats de ce DNA microarray concernant les gènes d'intérêts pour ce projet sont présentés en tableau 6. On peut observer une forte augmentation du niveau d'expression de AtPTR3 lors d'une infection par le mutant *hrcC*. À l'inverse, AtUMAMIT10 et AtUMAMIT33 sont fortement exprimés lorsque le pathogène ne porte aucune mutation et est capable d'injecter tous ses effecteurs de type 3.

Tableau 6 : Adapté de la banque de données publique BAR eplant, Stress biotique *P. syringae* eFP. Expression relative des gènes étudiés 24h DPI.

Gène étudié	Traitement contrôle (10 mM MgCl ₂)	Pathogène virulent (10 ⁸ UFC/mL pv tomato DC3000)	Déficiencia T3SS (10 ⁸ UFC/mL pv tomato DC3000 <i>hrcC</i>)
AtPTR3 (AT5G46050)	74,67	97,17	598,57
AtUMAMIT10 (AT3G56620)	27,43	99,77	30,53
AtUMAMIT33 (AT4G28040)	43,33	309	50,27

La valeur surlignée en rouge dans chaque ligne est significativement différente des valeurs surlignées en jaune, dans la même ligne.

Le second résultat préliminaire a été de confirmer que l'activation de la PTI de *A. thaliana*, par injection du flg22, 1 µM pendant 6h, entraînait une augmentation de l'expression de PTR3. La condition contrôle est une injection de MgCl₂ 10 mM. L'expression relative de PTR3 est mesurée par RT-qPCR. Cette technique nous permet de détecter l'augmentation de transcription d'un gène en ARNm par rapport à une condition contrôle. La flagelline 22 est un peptide dérivé de la protéine flagelline, qui permet de mimer la présence bactérienne et donc d'activer les réponses de défense de la plante. Cette expérience nous permet de voir l'effet sur l'expression du gène *PTR3* à la suite de la reconnaissance d'un pathogène comme *P. syringae*, par exemple.

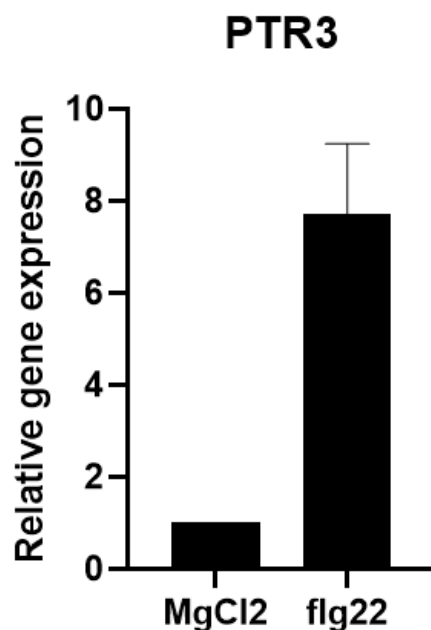


Figure 6 : Analyse de l'expression relative de PTR3 par qRT-PCR après activation de la PTI de Col-0 par injection de flg22

La plante est exposée à du flg22 1 μ M pendant 6h, l'analyse a été faite en triplicata biologique et technique.

L'exposition à la flg22 augmente l'expression relative de PTR3 (figure 6). Les test statistique t nous permet de confirmer que les 2 moyennes d'expression relative sont significativement différentes ($p = 0,0016$ à un intervalle de confiance de 99%). La transcription de PTR3 est 7,72 fois supérieure au contrôle. Ceci nous permet de conclure que l'activation de la PTI, après reconnaissance d'un composé bactérien tel que la flagelline 22, augmente l'expression du gène *AtPTR3*.

Pour confirmer les résultats des banques de données publiques, observés dans le tableau 6, nous avons mesuré l'expression relative de PTR3, UMAMIT10 et UMAMIT33 dans Col-0 dans un cas d'infection par *P. syringae* DC3000 (WT) et *P. syringae hrcC* (T3SS manquant).

Les résultats présentés dans la figure 7 montre que l'expression de

- PTR3 est augmentée de 30,5 +/- 1,1 fois, celle de UMAMIT10 par 2,1 +/- 0,4 fois et celle de UMAMIT33 par 0,3 +/- 0,1 fois suite à une infection par *hrcC* par rapport à l'injection contrôle de MgCl₂
- L'expression de PTR3 est multipliée par 1,4 +/- 0,2 fois, celle de UMAMIT10 par 37,26 +/- 8,49 fois et celle de UMAMIT33 par 8,6 +/- 1,5 fois suite à une infection par DC3000 par rapport à l'injection contrôle de MgCl₂.

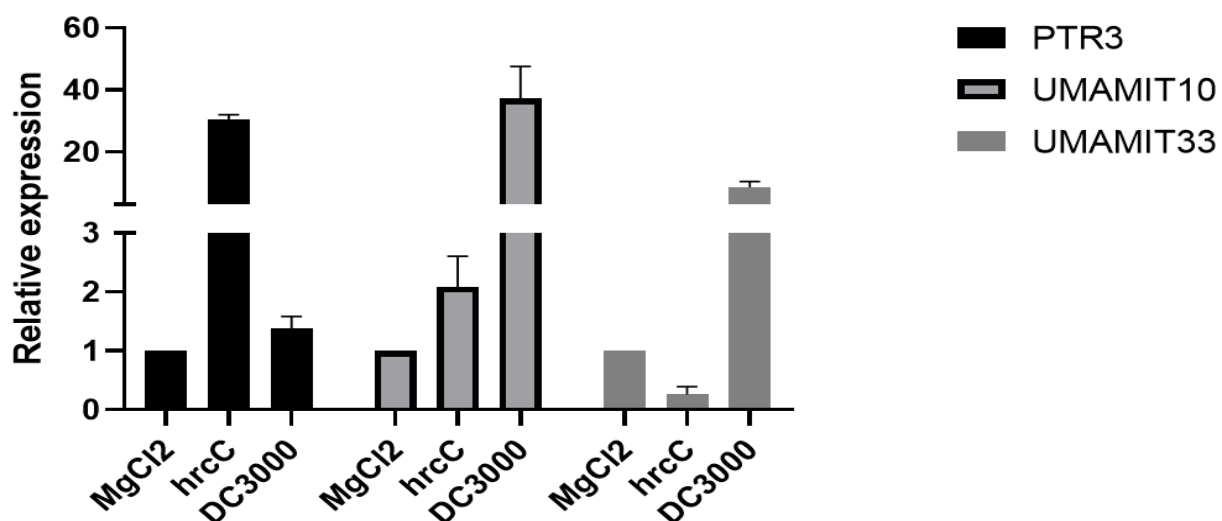


Figure 7 : Analyse de l'expression relative de gènes codant pour des transporteurs d'acides aminés

L'expression des gènes codant les transporteurs indiqués a été analysée par qRT-PCR dans *A. thaliana* Col-0, 1 jour post infection (DPI) avec *P. syringae* (10^8 UFC/mL, DO = 0,2). Le test de comparaison multiple de Sidak nous permet de conclure que les valeurs moyennes pour les

colonnes *hrcC* sont significativement différentes des valeurs moyennes des colonnes DC3000 (valeurs de p entre 0,000001 et 0,03)

Ces résultats suivent la tendance des données présentes dans le tableau 5. L'expression relative observée lors d'une infection par la souche *hrcC* résulte d'une réponse de la plante suite à la reconnaissance de *P. syringae*. Cette réponse n'est pas manipulée par le pathogène, car il n'est pas capable d'injecter ses effecteurs dans la cellule hôte. Cependant, quand le pathogène peut injecter ses effecteurs de type III (souche WT DC 3000), l'expression relative de PTR3 n'est pas augmentée. On suppose ici que les gènes fortement exprimés dans une condition d'infection par *hrcC* donnent un avantage à la plante et que *P. syringae* coupe cette réponse de défense par injection d'effecteurs de type III.

La souche virulente DC 3000 injecte ses effecteurs dans la cellule hôte pour manipuler les réponses de la plante et modifier son métabolisme. L'expression relative observée à la suite d'une infection par DC3000 résulte donc d'une manipulation par le pathogène ou d'une reconnaissance des effecteurs par la cellule hôte. L'expression relative des gènes *UMAMIT10* et *UMAMIT33* n'est pas augmentée par la plante à la suite d'une reconnaissance bactérienne, mais est fortement augmentée, quand le pathogène peut injecter ses effecteurs. On suppose donc que ces deux gènes donnent un avantage au pathogène et sont manipulés par celui-ci, pour son propre bénéfice.

3.2 Identification des potentiels effecteurs manipulant les transporteurs d'acides aminés

Nous avons confirmé que le pathogène *P. syringae* a besoin de ses effecteurs pour réguler l'expression de PTR3 et de UMAMIT. La suite logique du projet est donc d'essayer de déterminer quels effecteurs sont impliqués dans cette manipulation. Nous avons utilisé une banque de mutant de *P. syringae*. Ces mutants présentés dans le tableau 3 manquent un ou plusieurs clusters d'effecteurs présentés au tableau 1. Pour identifier quels effecteurs sont impliqués, nous avons analysé à nouveau l'expression relative de UMAMIT10 (figure 8) et de PTR3 (figure 9) après infection bactérienne ou une injection de $MgCl_2$ (contrôle).

Le but de cette expérience est de déterminer s'il y a une différence d'expression relative du gène d'intérêt entre la souche WT (DC3000) et les souches mutantes auxquelles il manque certains effecteurs ciblés. Si on voit une différence d'expression relative, c'est que les clusters délétés dans la souche indiquée étaient nécessaires pour la manipulation de ce gène et pour la virulence de *P. syringae*.

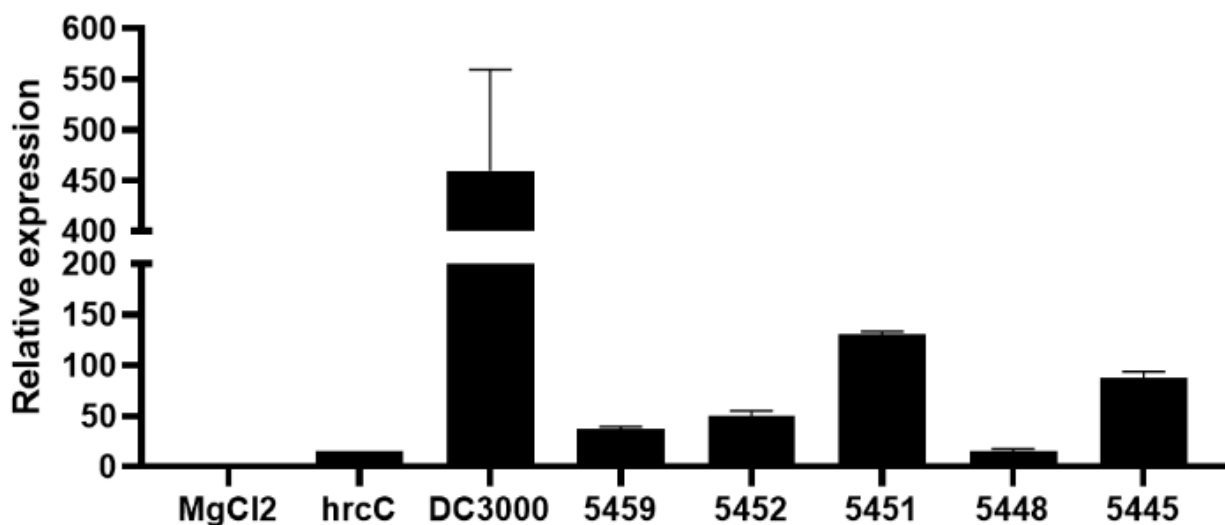


Figure 8 : Expression relative de UMAMIT-10 dans Col-0

1 DPI avec des souches mutantes de *P. syringae* sur différents clusters d'effecteurs (10^8 UFC/mL, DO = 0,2).

La figure 8 nous montre une forte différence d'expression relative de UMAMIT10, entre la souche WT et les souches mutantes. Les mutants 5459 5452 5451 5448 et 5445 ont tous des groupes de différents effecteurs mutés, présentés dans le tableau 3. Le test statistique de comparaison multiple de Dunett confirme que toutes les valeurs moyennes des mutants sont significativement différentes de la valeur moyenne de DC3000 (valeur de $p < 0,0001$ à un intervalle de confiance de 99,9% pour toutes les comparaisons) On suppose que l'un des clusters communs à toutes les souches est donc impliqué dans la manipulation de UMAMIT10 par *P. syringae*. Le seul groupe d'effecteurs mutés commun à toutes ces souches est le cluster II composé de *hopH1* et *hopC1*. Ces deux effecteurs sont fortement produits par la souche DC3000, mais leur fonction est encore inconnue (Chang *et al.* 2005; Ferreira *et al.* 2006).

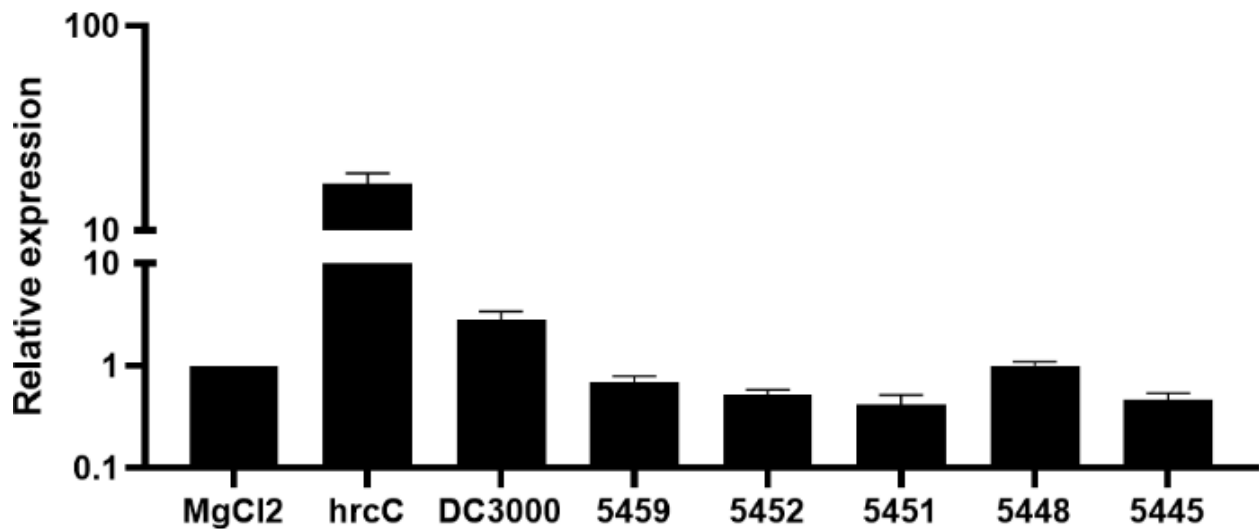


Figure 9 : Expression relative de PTR3 dans Col-0

1 DPI avec des souches mutantes de *P. syringae* sur différents clusters d'effecteurs (10^8 UFC/mL, DO = 0,2).

Sur la figure 9, le niveau d'expression relative de PTR3 n'est pas significativement différent entre la souche WT et les souches mutantes auxquelles il manque certains clusters d'effecteurs. Le test statistique de comparaison multiple de Dunett confirme que toutes les valeurs moyennes des mutants ne sont pas significativement différentes de la valeur moyenne de DC3000 (valeurs de p comprises entre 0,006 et 0,04 à un intervalle de confiance de 99,9% pour toutes les comparaisons). Ce même test fait en comparant la valeur moyenne de DC300 et la valeur moyenne de *hrcC* confirme qu'elles sont significativement différentes (valeur de $p < 0,0001$ avec un interval de confiance de 99,9%). Cela indique que dans les clusters délétés, aucun effecteur n'affecte la manipulation de l'expression de PTR3 par le pathogène.

3.3 Amorçage de la SAR par acide pipécolique (Pipecolic acid priming assay)

PTR3 et les UMAMIT sont des transporteurs d'acides aminés potentiellement impliqués dans la défense contre *P. syringae*. L'un des systèmes qui permet à la plante de se défendre contre les pathogènes est la SAR, comme présentée précédemment. FMO1 est un gène rapporteur de l'activation de la SAR par la voie de l'acide pipécolique (Zhang *et al.* 2018).

La lysine et l'histidine sont 2 acides aminés précurseurs de l'acide pipécolique. On a décrit précédemment que le transport d'acide pipécolique vers les feuilles était impératif pour l'activation de la SAR. Les Lysine Histidine Transporters (LHT) 1 et 7 sont deux transporteurs d'acides aminés déjà présentés dans la littérature scientifique et nous permettent de vérifier que le transport d'acides aminés joue un rôle clé dans l'activation de la SAR.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons fait un pip-priming assay sur *A. thaliana* Col-0, WT ou des mutants *lht1* et *lht7*. L'activation de la SAR sera déterminée en mesurant l'expression relative de FMO1. Si on voit une baisse de cette expression entre la plante contrôle et la plante mutante, c'est que le transporteur d'acide aminé muté est impliqué dans l'activation de la SAR.

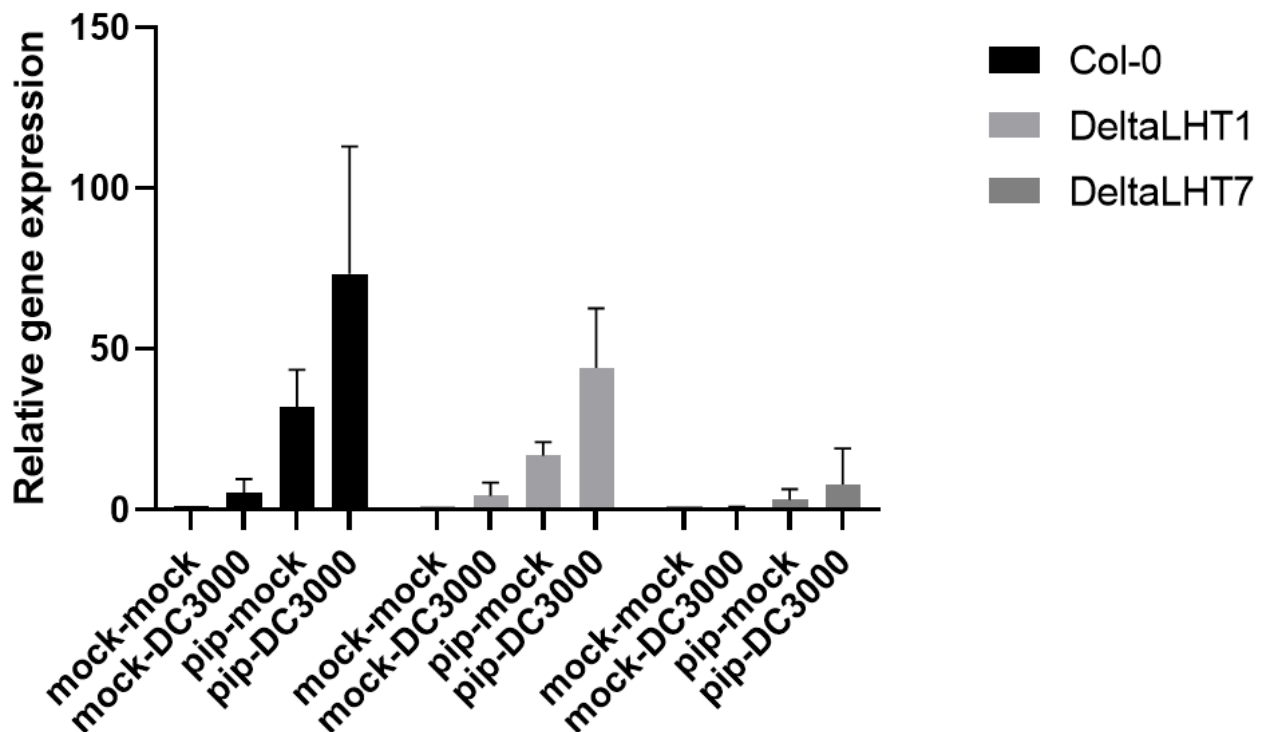


Figure 10 : Pip-priming assay sur les mutants *lht1* et *lht7*

L'expression relative de FMO1 est mesurée pour déterminer l'activation de la SAR dépendante de l'acide pipécolique.

En suivant les différentes conditions du pip-priming assay présentées au tableau 5, la figure 10 nous montre une forte diminution de l'expression relative de FMO1 sur les mutants LHT7. Le test de comparaisons multiples de Tukey nous confirme que la moyenne des colonnes pip-DC3000 de chaque condition sont différentes les unes des autres (valeur de p comprises entre 0,0001 et 0,03). Ce mutant semble avoir du mal à activer la SAR, dépendante de l'acide pipécolique, qui donne une forte réponse défensive pendant l'infection par *P. syringae* DC3000.

3.4 Résultats des décomptes bactériens

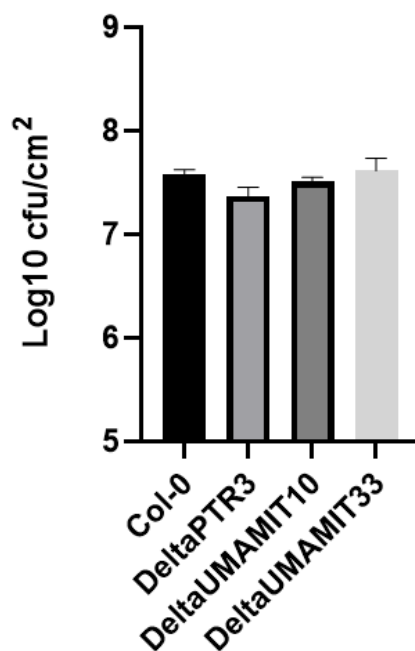


Figure 11 : Décompte bactérien sur *A. thaliana* Col-0 WT, et les mutant *ptr3*, *umamit10* ou *umamit33*

3 DPI avec *P. syringae* DC3000 (10^5 UFC/mL, DO = 0,0002)

Après avoir infecté les feuilles des différentes plantes avec *P. syringae*, les échantillons de feuilles sont prélevés, broyés, dilués et étendus sur des géloses LBA, puis comptés 3 jours après. Les décomptes bactériens de *A. thaliana* Col-0 et des mutants sur PTR3, UMAMIT10 et UMAMIT33 ne sont pas significativement différents. Le test statistique de comparaison multiple de Dunnett confirme qu'aucune valeur moyenne des décompte bactériens avec les plantes mutantes n'est significativement différents de la valeur moyenne du décompte avec Col-0 (Valeur de P comprise entre 0,03 et 0,90 à un intervalle de confiance de 99,9%) C'est-à-dire qu'après 3 jours de croissance bactérienne dans les feuilles, le pathogène se développe aussi rapidement dans une plante avec ou sans les transporteurs d'acides aminés étudiés.

Les résultats de la figure 11 allant à l'encontre de l'hypothèse selon laquelle les effecteurs auraient un impact sur le fitness du pathogène, nous avons effectué des décomptes bactériens sur des mutants *A. thaliana* sans les LHT 1 et 7, car nous avons déjà démontré que ces transporteurs avaient un rôle à jouer dans l'expression de FMO1 qui est un marqueur de la SAR.

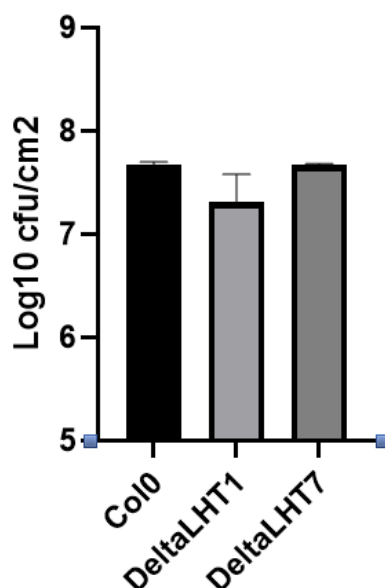


Figure 12 : Décompte bactérien sur *A. thaliana* Col-0 WT, et les mutants *lht1*, *lht7*

3 DPI avec *P. syringae* DC3000 (10^5 UFC/mL, DO=0,0002)

La figure 12 met en évidence le même résultat que la figure 11 : il n'y a aucune différence significative sur le développement du pathogène dans les feuilles même si des transporteurs d'acides aminés impliqués dans l'activation de la SAR sont mutés. Ce résultat nous permet de supposer que la mutation d'un seul transporteur d'acides aminés ne change pas nécessairement le fitness de la bactérie, même si ce transporteur d'acides aminés est reconnu comme étant impliqué dans le système de défense de la plante contre la bactérie.

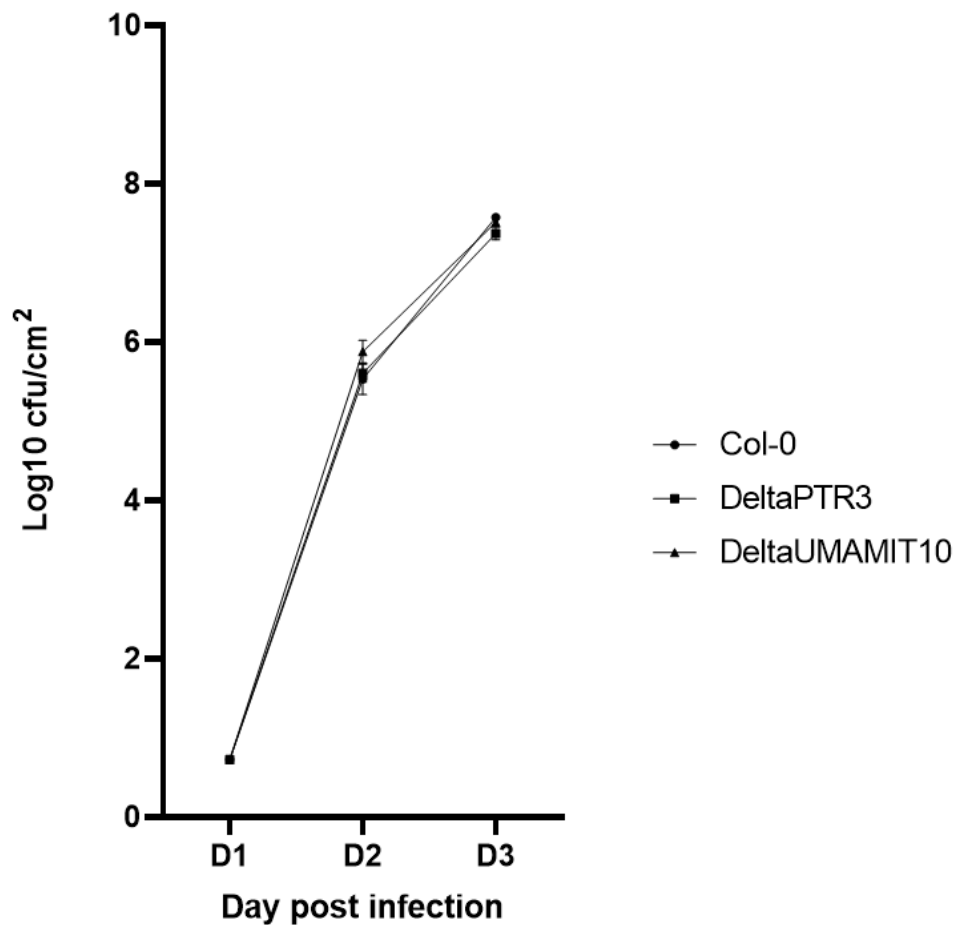


Figure 13 : Décomptes bactériens sur 3 jours (par intervalle de 24h) sur *A. thaliana* Col-0 WT, et les mutants *ptr3*, *umamit10* ou *umamit33*

3 DPI avec *P. syringae* DC3000 (10^5 UFC/mL, DO=0,0002).

Les résultats des figures 11 et 12, étant analysés après 3 jours post-infection, nous avons répété l'expérience de la figure 11, mais la figure 13 nous montre que la quantité de bactérie dans les feuilles a été mesurée chaque jour pendant la durée de l'expérience. Cette expérience était nécessaire pour observer la vitesse de développement de la bactérie dans les différentes plantes testées. Encore une fois, le résultat du décompte bactérien est négatif; il n'y a aucune différence significative entre la plante contrôle et les plantes mutantes.

CHAPITRE 4

DISCUSSION ET CONCLUSION

4.1 Discussion

Le transport d'acides aminés à la suite d'une infection de *A. thaliana* par *P. syringae* est encore peu connu. Il a été prouvé que la réabsorption de nutriments, tel que le sucre, par les transporteurs STP de la cellule hôte, est l'une des stratégies de défense de la plante pour affamer son agresseur (Chen *et al.* 2010).

L'hypothèse de départ était donc que de façon similaire, les transporteurs d'acides aminés sont impliqués dans la défense de la plante à la suite d'une infection du pathogène *P. syringae*. Les résultats de données publiques produits par le laboratoire de Nuemberger, dans le cadre du projet AtGeneExpress, ont permis d'identifier un couple de transporteurs d'acides aminés, PTR3 et UMAMIT. PTR3 est un importeur qui transporte les acides aminés de l'apoplasme vers le cytoplasme, tandis que UMAMIT est un exporteur d'acides aminés.

Il a été démontré qu'un mutant *A. thaliana*, auquel il manque le transporteur PTR3, est plus sensible à *P. syringae* (Karim *et al.* 2007). Cependant, il n'a pas été démontré que les transporteurs UMAMIT sont impliqués dans la défense de la plante.

Le but de ce projet était, dans un premier temps, de mettre en évidence la manipulation de l'expression des transporteurs PTR3, UMAMIT 10 et UMAMIT 33 par *P. syringae*, pour son propre bénéfice. Que ce soit augmenter l'expression de l'un pour avoir accès à plus de nutriments (UMAMIT) ou compromettre l'expression de l'autre pour empêcher la plante de l'affamer (PTR3).

Le second objectif de ce projet est de montrer l'implication des transporteurs d'acides aminés dans l'activation de la SAR dépendante de l'acide pipécolique. Pour ceci, nous avons travaillé avec 2 transporteurs d'acides aminés transportant la lysine et l'histidine, lesquels sont des précurseurs de l'acide pipécolique: LHT1 et LHT7.

Pour répondre à la première hypothèse, nous avons fait des tests RT-qPCR sur *A. thaliana* Col-0 à la suite d'une infection par *P. syringae* Pv tomato DC3000 et avons observé l'expression relative des différents transporteurs d'acides aminés étudiés (figure 7). Ceci nous a permis de confirmer les résultats d'une banque de données publique (tableau 6), de montrer que l'expression de PTR3 est compromise par le pathogène et que l'expression des UMAMIT est augmentée par le pathogène à la suite d'une injection d'effecteurs de type III dans la cellule hôte. *P. syringae* *hrcC* est incapable de manipuler l'expression de ces transporteurs, car il n'a pas de système de sécrétion type III (T3SS) nécessaire à l'injection des effecteurs, à l'inverse de DC3000.

La conclusion émise à la figure 8 est que l'un des clusters d'effecteurs de type III est nécessaire : le cluster II contenant hopH1 et hopC1. Bien que la fonction précise de ces deux effecteurs ne soit pas connue, il a été démontré que la virulence de la souche CUCPB5445 (mutant sur le cluster II) est fortement diminuée. Le cluster II contribue à la sévérité des symptômes de lésions chez *A.thalina*, *Nicotiana benthamiana*, et la tomate, ceci suggère que la fonction de ces effecteurs n'est pas spécifique à une seule plante (Wei *et al.* 2007).

Une suite possible pour ce projet serait de compléter la souche mutante CUCPB5445 afin de confirmer l'implication des effecteurs dans ce phénomène. Un matériel utilisable pour ceci serait des plasmides comme pCPP5053, qui contient l'insert hopC1 et pCPP5306 qui contient l'insert hopH1 (Munkvold *et al.* 2008). Ces plasmides seraient utiles pour pouvoir faire une transformation bactérienne sur la souche mutante CUCPB5445 (Δ II) et ainsi lui redonner ces effecteurs, un par un, pour déterminer leur fonction, c'est-à-dire faire une souche Δ II+hopC1 et une souche Δ II+hopH1.

Ces nouvelles souches nous permettraient de savoir si les deux effecteurs sont nécessaires pour manipuler l'expression de UMAMIT10 ou non. Il est possible que cette manipulation vienne d'un seul effecteur ou d'une association de deux effecteurs. Si l'une des nouvelles souches récupère sa virulence et sa capacité à manipuler l'expression de UMAMIT10, cela pointerait dans la direction d'une fonction dépendante d'un seul effecteur. Ce nouveau matériel permettra également de confirmer ces résultats intéressants et d'encourager la création de nouveaux projets pour identifier la fonction des effecteurs du cluster II. Les résultats que nous obtenons dans ce mémoire nous indique l'importance du cluster II, mais il faut encore faire plus de recherche pour déterminer la fonction précise de ces deux effecteurs.

Les différents décomptes bactériens (figures 11, 12 et 13) n'ont montré aucunes différences significatives entre les plantes *A. thaliana Col-0* et les plantes *ptr3*, *umamit10*, *umamit33*, *lht1* et *lht7*. En d'autres termes, on peut compter autant de bactérie dans les feuilles infectées d'une plante WT que dans les feuilles infectées de l'un de ces mutants. On suppose que bloquer l'expression d'un seul transporteur d'acides aminés ne suffit pas à changer le fitness du pathogène *P. syringae*.

L'impact d'une mutation sur un unique transporteur d'acides aminés n'est pas assez important pour modifier la vitesse de croissance du pathogène. Répéter cette expérience avec des doubles mutants (*umamit10/umamit33*, par exemple) pourrait montrer une différence significative sur le fitness du pathogène. En effet, une autre étude sur les UMAMIT 14 et 18 a montré que le double mutant *umamit14/umamit18* avait beaucoup plus d'impact sur la réduction des échanges d'acides aminés par rapport au simple mutant *umamit14* (Besnard *et al.* 2016).

Avant la fin des expérimentations, nous avons pu produire des *A. thaliana* double mutants *umamit10/umamit33*. La personne prenant la suite du projet pourra utiliser ce nouveau matériel végétal pour faire des RT-qPCR, pip-priming assay ou décomptes bactériens.

Pour répondre à la seconde hypothèse, nous avons effectué un pip-priming assay sur les mutants *lht1* et *lht7* (figure 10). Il nous permet de conclure que les transporteurs LHT1 et LHT7 sont impliqués dans l'activation de la SAR dépendante de l'acide pipécolique, car le gène rapporteur FMO1 est bien moins exprimé chez les plantes mutantes Δ LHT1 et Δ LHT7. Ces deux transporteurs véhiculent deux acides aminés, la lysine et l'histidine, qui sont des précurseurs de l'acide pipécolique. Un transporteur d'acide aminé peut donc être impliqué dans la signalisation de défense de la plante lors de l'activation de la SAR dépendante de l'acide pipécolique. Il faudra répéter cette expérience pour tester l'activation de la SAR après une infection par *P. syringae*.

La suite logique de cette expérience est d'effectuer un pip-priming assay sur les mutants Δ PTR3, Δ UAMIT10, Δ UMAMIT33 et le double mutant Δ UAMIT10/ Δ UMAMIT33. Ce sont des transporteurs non spécifiques (Eom *et al.* 2015; Müller *et al.* 2015); nous pouvons donc émettre l'hypothèse qu'ils pourraient avoir un impact sur le transport de l'acide pipécolique comme les transporteurs LHT1 et LHT7. Si ce futur pip-priming assay donne les mêmes résultats que la figure 10, cela prouverait que PTR3 ou les UMAMIT ont également un rôle à jouer dans la signalisation systémique d'un signal de défense dans la plante.

Comme nous pouvons le voir, il reste encore des expériences intéressantes à faire sur ce projet pour préciser le rôle de PTR3 de UMAMIT10 et UMAMIT33 et des effecteurs les manipulant.

4.2 Conclusion

Le modèle "zig-zag" entre les systèmes de reconnaissance et de défense de *A. thaliana*, et le pathogène virulent *P. syringae* pv *tomato* DC3000, est de plus en plus étudié. En effet, l'étude de ce patho-système permet de comprendre les interactions moléculaires entre un pathogène et la cellule hôte végétale.

L'une des stratégies connues de la plante pour contrer une infection d'un pathogène est la réabsorption de sucres dans le cytoplasme afin d'affamer son agresseur qui se développe dans l'apoplasme. Au travers des expériences présentées dans ce mémoire, nous montrons que la manipulation du transport des acides aminés est importante.

Les résultats des RT-qPCR suggèrent que l'expression de UMAMIT10 est réduite par la plante après reconnaissance du pathogène, mais est fortement augmentée après l'injection des effecteurs de type 3 par le système de sécrétion de *P. syringae*. De plus, les effecteurs responsables de cette augmentation d'expression seraient les effecteurs du cluster II : hopH1 et hopC1.

À l'inverse, PTR3 est un transporteur d'acides aminés qui va donner un avantage à la plante. Même si nous pouvons avancer que des effecteurs de type III sont responsables de la diminution de l'expression de PTR3 lors d'une infection, nous n'avons pas pu identifier de potentiels effecteurs responsables de cet effet.

Enfin, les résultats de pip-priming assay montrent l'importance de certains transporteurs d'acides aminés comme LHT1 et LHT7 dans l'activation de la SAR dépendante de l'acide pipécolique. Il reste à répéter ce test de pip-priming assay avec les mutants Δ PTR3, Δ UAMIT10, Δ UMAMIT33 et le double mutant Δ UAMIT10/ Δ UMAMIT33.

Comme nous l'avons précisé dans la discussion, il reste encore des expériences à effectuer pour déterminer la fonction précise des effecteurs hopH1, hopC1, et des transporteurs d'acides aminés PTR3, UMAMIT10 et UMAMIT33. Investiguer leur rôle permettra de mieux comprendre les mécanismes déclenchés par une infection de *P. syringae*.

CHAPITRE 5

BIBLIOGRAPHIE

Ahuja, Ishita, Ralph Kissen, and Atle M. Bones. (2012). “Phytoalexins in Defense against Pathogens.” *Trends in Plant Science* 17 : 73–90. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.11.002>.

Almagro, Anabel, Hua Lin Shan, and Fang Tsay Yi. (2008). “Characterization of the *Arabidopsis* Nitrate Transporter NRT1.6 Reveals a Role of Nitrate in Early Embryo Development.” *Plant Cell* 20 : 3289–99. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.056788>.

Bernsdorff, Friederike, Anne-christin Döring, Katrin Gruner, Stefan Schuck, and Andrea Bräutigam. (2016). “Pipecolic Acid Orchestrates Plant Systemic Acquired Resistance and Defense Priming via Salicylic Acid-Dependent and -Independent Pathways” *The plant cell* 28 : 102–29. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00496>.

Besnard, Julien, Réjane Pratelli, Chengsong Zhao, Unnati Sonawala, Eva Collakova, Guillaume Pilot, and Sakiko Okumoto. (2016). “UMAMIT14 Is an Amino Acid Exporter Involved in Phloem Unloading in *Arabidopsis* Roots.” *Journal of Experimental Botany* 67 : 6385–97. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw412>.

Bezruczyk, Margaret, Jungil Yang, Joon-seob Eom, Matthew Prior, Davide Sosso, Thomas Hartwig, Boris Szurek, *et al.* (2018). “Sugar Flux and Signaling in Plant – Microbe Interactions,” *The plant journal* 93 : 675–85. <https://doi.org/10.1111/tpj.13775>.

Chang, Abraham B., Ron Lin, W. Keith Studley, Can V. Tran, and Milton H. Saier. (2004). “Phylogeny as a Guide to Structure and Function of Membrane Transport Proteins.” *Molecular Membrane Biology* 21:171–81. <https://doi.org/10.1080/09687680410001720830>.

Chang, Jeff H., Jonathan M. Urbach, Terry F. Law, Larry W. Arnold, An Hu, Saurabh Gombar, Sarah R. Grant, Frederick M. Ausubel, and Jeffery L. Dangl. (2005). “A High-Throughput, near-Saturating Screen for Type III Effector Genes from *P. syringae*.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 : 2549–54. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409660102>.

Chen, Li Qing, Bi Huei Hou, Sylvie Lalonde, Hitomi Takanaga, Mara L. Hartung, Xiao Qing Qu, Woei Jiun Guo, *et al.* (2010). “Sugar Transporters for Intercellular Exchange and Nutrition of Pathogens.” *Nature* 468 : 527–32. <https://doi.org/10.1038/nature09606>.

Chinchilla, Delphine, Cyril Zipfel, Silke Robatzek, Birgit Kemmerling, Thorsten Nürnberger, Jonathan D.G. Jones, Georg Felix, and Thomas Boller. (2007). “A Flagellin-Induced Complex of the Receptor FLS2 and BAK1 Initiates Plant Defence.” *Nature* 448 : 497–500. <https://doi.org/10.1038/nature05999>.

Cunnac, S., S. Chakravarthy, B. H. Kvitko, A. B. Russell, G. B. Martin, and A. Collmer. (2011). “Genetic Disassembly and Combinatorial Reassembly Identify a Minimal Functional Repertoire of Type III Effectors in *P. syringae*.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 : 2975–80. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013031108>.

Eom, Joon Seob, Li Qing Chen, Davide Sosso, Benjamin T. Julius, I. W. Lin, Xiao Qing Qu, David M. Braun, and Wolf B. Frommer. (2015). “SWEETs, Transporters for Intracellular and Intercellular Sugar Translocation.” *Current Opinion in Plant Biology* 25: 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.04.005>.

Fernández, Victoria, Paula Guzmán-Delgado, José Graça, Sara Santos, and Luis Gil. (2016). “Cuticle Structure in Relation to Chemical Composition: Re-Assessing the Prevailing Model.” *Frontiers in Plant Science* 7 : 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00427>.

Ferreira, Adriana O., Christopher R. Myers, Jeffrey S. Gordon, Gregory B. Martin, Monica Vencato, Alan Collmer, Misty D. Wehling, *et al.* (2006). “Whole-Genome Expression Profiling Defines the HrpL Regulon of *P. syringae* Pv. Tomato DC3000, Allows de Novo Reconstruction of the Hrp Cis Element, and Identifies Novel Coregulated Genes.” *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19 : 1167–79. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19 1167>.

Foley, Jonathan A, Navin Ramankutty, Kate A Brauman, Emily S Cassidy, James S Gerber, Matt Johnston, Nathaniel D Mueller, *et al.* (2011). “Solutions for a Cultivated Planet.” *Nature* 478 : 337–42 <https://doi.org/10.1038/nature10452>.

Galván, A., and E. Fernández. (2001). “Eukaryotic Nitrate and Nitrite Transporters.” *Cellular and Molecular Life Sciences* 58 : 225–33. <https://doi.org/10.1007/PL00000850>.

Grant, Sarah R., Emily J. Fisher, Jeff H. Chang, Beth M. Mole, and Jeffery L. Dangl. (2006). "Subterfuge and Manipulation: Type III Effector Proteins of Phytopathogenic Bacteria." *Annual Review of Microbiology* 60 : 425–49. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.60.080805.142251>.

Jeworutzki, Elena, M. Rob G. Roelfsema, Uta Anschütz, Elzbieta Krol, J. Theo M. Elzenga, Georg Felix, Thomas Boller, Rainer Hedrich, and Dirk Becker. (2010). "Early Signaling through the Arabidopsis Pattern Recognition Receptors FLS2 and EFR Involves Ca²⁺-Associated Opening of Plasma Membrane Anion Channels." *Plant Journal* 62 : 367–78. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2010.04155.x>.

Karim, Sazzad, Kjell-ove Holmström Abul, Peter Dahl, Stefan Hohmann, Günter Brader, E Tapio Palva, and Minna Pirhonen. (2007). "AtPTR3 , a Wound-Induced Peptide Transporter Needed for Defence against Virulent Bacterial Pathogens in Arabidopsis," *Planta* 225 : 1431–45. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0451-5>.

Karim, Sazzad, and Æ Dan Lundh. (2005). "Structural and Functional Characterization of AtPTR3 , a Stress-Induced Peptide Transporter of Arabidopsis," *J Mol Model* 11 : 226–36. <https://doi.org/10.1007/s00894-005-0257-6>.

Lange, Orlando de, Tom Schreiber, Niklas Schandry, Jara Radeck, Karl Heinz Braun, Julia Koszinowski, Holger Heuer, Annett Strauß, and Thomas Lahaye. (2013). "Breaking the DNA-Binding Code of Ralstonia Solanacearum TAL Effectors Provides New Possibilities to Generate Plant Resistance Genes against Bacterial Wilt Disease." *New Phytologist* 199 : 773–86. <https://doi.org/10.1111/nph.12324>.

Lemonnier, Pauline, Cécile Gaillard, Florian Veillet, Jérémy Verbeke, Rémi Lemoine, Pierre Coutos-Thévenot, and Sylvain La Camera. (2014). "Expression of Arabidopsis Sugar Transport Protein STP13 Differentially Affects Glucose Transport Activity and Basal Resistance to Botrytis Cinerea." *Plant Molecular Biology* 85 : 473–84. <https://doi.org/10.1007/s11103-014-0198-5>.

Lin, Chung Ming, Serry Koh, Gary Stacey, Su May Yu, Tsai Yun Lin, and Yi Fang Tsay. (2000). "Cloning and Functional Characterization of a Constitutively Expressed Nitrate Transporter Gene, OsNRT1, from Rice." *Plant Physiology* 122 : 379–88. <https://doi.org/10.1104/pp.122.2.379>.

Ludewing, Uwe, and Wolfgang Koch. (2008). "Amino Acid Transporters in Plants." *Plant Membrane and Vacuolar Transporters* 1465 : 267–82. <https://doi.org/10.1079/9781845934026.0267>.

Muir, James F, Jules Pretty, Sherman Robinson, Sandy M Thomas, and Camilla Toulmin. (2010). "Food Security : The Challenge Of Feeding 9 Billion People" *Science* 327 : 812–18. [10.1126/science.1185383](https://doi.org/10.1126/science.1185383)

Müller, Benedikt, Astrid Fastner, Julia Karmann, Verena Mansch, Thomas Hoffmann, Wilfried Schwab, Marianne Suter-Grotemeyer, *et al.* (2015). "Amino Acid Export in Developing Arabidopsis Seeds Depends on UmamiT Facilitators." *Current Biology* 25 : 3126–31. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.10.038>.

Munkvold, Kathy R., Michael E. Martin, Philip A. Bronstein, and Alan Collmer. (2008). "A Survey of the *P. syringae* Pv. Tomato DC3000 Type III Secretion System Effector Repertoire Reveals Several Effectors That Are Deleterious When Expressed in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21 : 490–502. <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-4-0490>.

Nomura, Kinya, Maeli Melotto, and Sheng Yang He. (2005). "Suppression of Host Defense in Compatible Plant-*Pseudomonas syringae* Interactions." *Current Opinion in Plant Biology* 8 : 361–68. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.05.005>.

O'Brien, Jose A., Arsalan Daudi, Vernon S. Butt, and G. Paul Bolwell. (2012). "Reactive Oxygen Species and Their Role in Plant Defence and Cell Wall Metabolism." *Planta* 236 : 765–79. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1696-9>.

Poczai, Péter, István Cernák, Ildikó Varga, and Jaakko Hyvönen. (2014). "Analysis of the Genome Sequence of the Flowering Plant *Arabidopsis thaliana*." *Genetic Resources and Crop Evolution* 61 : 796–815. <https://doi.org/10.1134/S1022795411020074>.

Ray, Deepak K, Nathaniel D Mueller, Paul C West, and Jonathan A Foley. (2013). "Yield Trends Are Insufficient to Double Global Crop Production by 2050" *Plos one* 8 : e66428. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066428>.

Rédei, George P. (2008). "Major Facilitator Superfamily (MFS)." *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics* 62 : 1142–1142. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6754-9_9778.

Rubartelli, Anna, and Michael T. Lotze. (2007). "Inside, Outside, Upside down: Damage-Associated Molecular-Pattern Molecules (DAMPs) and Redox." *Trends in Immunology* 28 : 429–36. <https://doi.org/10.1016/j.it.2007.08.004>.

Saier, Milton H. (2000). "A Functional-Phylogenetic Classification System for Transmembrane Solute Transporters." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64 : 354–411. <https://doi.org/10.1128/membr.64.2.354-411.2000>.

Savary, Serge, Laetitia Willocquet, Sarah Jane Pethybridge, Paul Esker, Neil McRoberts, and Andy Nelson. (2019). "The Global Burden of Pathogens and Pests on Major Food Crops." *Nature Ecology and Evolution* 3 : 430–39. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0793-y>.

Tegeder, Mechthild, and Doris Rentsch. (2010). "Uptake and Partitioning of Amino Acids and Peptides." *Molecular Plant* 3 : 997–1011. <https://doi.org/10.1093/mp/ssq047>.

Tilman, David, Christian Balzer, Jason Hill, and Belinda L Befort. (2011). "Global Food Demand and the Sustainable Intensification of Agriculture" *PNAS* 108 : 20260-264. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116437108>.

Wang, Qi, Nadia Shakoor Id, Adam Boyher, Kira M Veley Id, Jeffrey C Berry Id, C Mockler Id, and Rebecca S Bart Id. (2021). "Escalation in the Host-Pathogen Arms Race: A Host Resistance Response Corresponds to a Heightened Bacterial Virulence Response," *PLOS pathogens* 17 : e1009175. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009175>.

Wei, Chia-fong, Alistair B Russell, B Gregory, Brian H Kvitko, Duck Hwan Park, David J Schneider, and Alan Collmer. (2009). "Deletions in the Repertoire of *Pseudomonas syringae* Pv . Tomato DC3000 Type III Secretion Effector Genes Reveal Functional Overlap among Effectors" *PLOS pathogens* 5 : e1000388 <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000388>.

Wei, Chia Fong, Brian H. Kvitko, Rena Shimizu, Emerson Crabill, James R. Alfano, Nai Chun Lin, Gregory B. Martin, Hsiou Chen Huang, and Alan Collmer. (2007). "A *P. syringae* Pv. Tomato DC3000 Mutant Lacking the Type III Effector HopQ1-1 Is Able to Cause Disease in the Model Plant *Nicotiana Benthamiana*." *Plant Journal* 51 : 32–46. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03126.x>.

Yamaguchi, Yube, and Alisa Huffaker. (2011). "Endogenous Peptide Elicitors in Higher Plants." *Current Opinion in Plant Biology* 14 : 351–57. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.05.001>.

Yao, Xuehui, Jing Nie, Ruoxue Bai, and Xiaolei Sui. (2020). "Amino Acid Transporters in Plants: Identification and Function." *Plants* 9 : 1–17. <https://doi.org/10.3390/plants9080972>.

Zhang, Wei, Feng Zhao, Lihui Jiang, Cun Chen, Lintao Wu, and Zhibin Liu. (2018). "Different Pathogen Defense Strategies in Arabidopsis: More than Pathogen Recognition." *Cells* 7 : 252. <https://doi.org/10.3390/cells7120252>.

